

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-013413

(43)Date of publication of application : 19.01.2001

(51)Int.Cl.

G02B 21/00

(21)Application number : 11-188383

(71)Applicant : NIKON CORP

(22)Date of filing : 02.07.1999

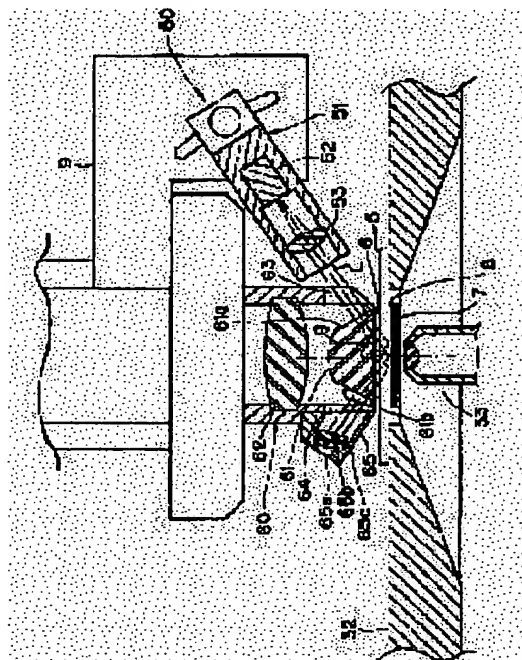
(72)Inventor : KAWAHITO TAKASHI

## (54) MICROSCOPE

## (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To enable fluorescent observation by evanescent illumination and high-resolution observation by transmitted illumination to be executed without changing an optical system.

**SOLUTION:** This microscope is constituted so that an immersion system condenser lens 60 is used and a sample in water solution 8 can be observed by evanescent light and also by the transmitted illumination. Then, an incident surface and an emitting surface are formed at a first lens 61 of the lens 60 so that an incident angle of the light made incident on the solution 8 becomes the critical angle and the evanescent light is generated near the incident surface.



## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-13413

(P2001-13413A)

(43) 公開日 平成13年1月19日 (2001.1.19)

(51) Int.Cl.

G 0 2 B 21/00

識別記号

F I

G 0 2 B 21/00

ターム(参考)

2 H 0 5 2

審査請求 未請求 請求項の数1 OL (全5頁)

(21) 出願番号 特願平11-188383

(22) 出願日 平成11年7月2日 (1999.7.2)

(71) 出願人 000004112

株式会社ニコン

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号

(72) 発明者 川人 敬

東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株

式会社ニコン内

(74) 代理人 100091557

弁理士 木内 修

Fターム(参考) 2H052 AA05 AA09 AC00 AC04 AC05

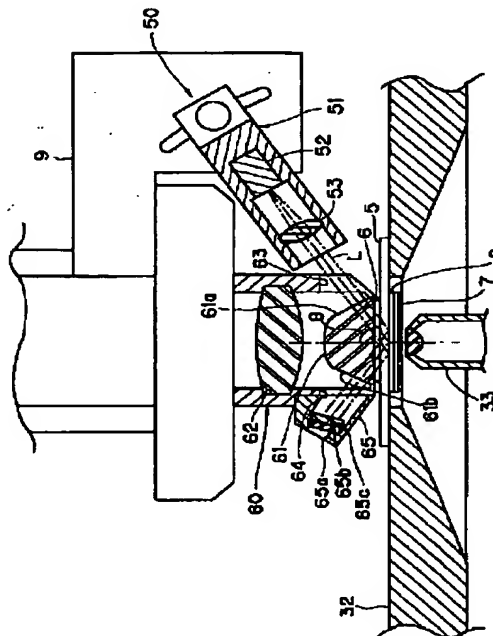
AC20 AC25 AC34 AD34

(54) 【発明の名称】 顕微鏡

## (57) 【要約】

【課題】 光学系を変更することなくエバネッセント照明による蛍光観察と高分解能の透過照明観察とを行うことができる顕微鏡を提供する。

【解決手段】 液浸系コンデンサレンズ60を使用し、エバネッセント光によって水溶液8中の試料の観察を行うことができるとともに、透過照明による観察を行うことができる顕微鏡において、液浸系コンデンサレンズ60の先玉61に、水溶液8に対する光の入射角が臨界角となるように入射面と出射面とを形成し、入射面の近傍にエバネッセント光を発生させた。



## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 液浸系コンデンサレンズを使用し、エバネッセント光によって水溶液中の試料の観察を行うことができるとともに、透過照明による観察を行うことができる顕微鏡において、前記液浸系コンデンサレンズの先玉に、前記水溶液に対する前記エバネッセント光を発生させる光の入射角が臨界角となるように、入射面と出射面とが形成されていることを特徴とする顕微鏡。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】 この発明は顕微鏡に関する。

## 【0002】

【従来の技術】 エバネッセント光を顕微鏡の励起光として利用する技術は、ノイズ成分である背景光の少ない照明光学系が得られるため、微弱な蛍光を取り扱う生体分子（たんぱく質等）の蛍光観察に一般的に利用されている。図4は従来のエバネッセント照明装置を備える顕微鏡の部分拡大断面図である。

【0003】 従来のエバネッセント照明装置150は、励起レーザ光L3を出射するエバネッセント投光管151と自家蛍光の少ない石英で作られた台形のプリズム160とを備える。

【0004】 エバネッセント投光管151は顕微鏡のステージ132の上方に支持台109によって回転可能に支持されている。

【0005】 プリズム160の側面にはスライドガラス105と水溶液108との境界面にレーザ光L3が臨界角で入射でき出射できるように入射面161aと出射面161bとがそれぞれ形成されている。

【0006】 プリズム160の底面は屈折率がほぼ等しいオイル106の層を介してスライドガラス105の上面に接している。スライドガラス105の下面とカバーガラス107との間には試料が存在する水溶液108が挟まれている。

【0007】 入射面161aから励起レーザ光を、屈折率の高いスライドガラスと屈折率の低い水溶液とが接する境界面に臨界角で入射させたとき、境界面の近傍150nm程度の領域にエバネッセント光が発生する。

【0008】 このエバネッセント光によって試料中の蛍光色素が励起されて蛍光を発し、対物レンズ133によって試料の蛍光像が結像される。

## 【0009】

【発明が解決しようとする課題】 ところで、透過光によって蛍光観察以外の観察を行う場合がある。

【0010】 しかし、プリズム160は入射光の光束を確保するために1mm以上の厚みとなることがあるため、開口数が多い（分解能が高い）液浸系コンデンサレンズを同時に使用することができず、エバネッセント照明による蛍光観察と高倍率かつ高分解能の透過照明観

察とを光学系を変更することなく行うことができない。

【0011】 この発明はこのような事情に鑑みてなされたもので、その課題は光学系を変更することなくエバネッセント照明による蛍光観察と高分解能の透過照明観察とを行うことができる顕微鏡を提供することである。

## 【0012】

【課題を解決するための手段】 前述の課題を解決するため請求項1記載の発明は、液浸系コンデンサレンズを使用し、エバネッセント光によって水溶液中の試料の観察を行うことができるとともに、透過照明による観察を行うことができる顕微鏡において、前記液浸系コンデンサレンズの先玉に、前記水溶液に対する前記エバネッセント光を発生させる光の入射角が臨界角となるように、入射面と出射面とが形成されていることを特徴とする。

【0013】 光がコンデンサレンズの先玉に形成された入射面から入射し、水溶液とスライドガラスとの境界面で全反射されて出射面から出射される。このとき、境界面の近傍150nm程度の領域でエバネッセント光が発生し、励起光として水溶液中の試料の蛍光色素が励起され蛍光を発する。そして、対物レンズによって試料の蛍光像が結像される。一方、コンデンサレンズへ導かれた透過照明光はスライドガラスを通して水溶液中の試料を照明する。そして、対物レンズによって試料の像が結像される。ここで、先玉はコンデンサレンズを構成する複数のレンズの内、観察状態においてスライドガラスを含む試料面と対向する先端のレンズをいうものとする。

## 【0014】

【発明の実施の形態】 以下、この発明の実施の形態を図面に基づいて説明する。

【0015】 図1はこの発明の一実施形態に係る顕微鏡の側面図、図2は図1のII-II矢視図である。

【0016】 倒立顕微鏡は、顕微鏡ボディ10と、照明支柱20と、ステージユニット30と、落射蛍光ユニット40と、エバネッセント照明装置50とを備える。

【0017】 顕微鏡ボディ10のベース11の一端に照明支柱20が設けられている。

【0018】 照明支柱20は垂直部21とこの垂直部21の上端から水平に延びる水平部22とで構成される。垂直部21の上端の背面側にはランプハウス23が設けられ、水平部22には取付部24を介してコンデンサレンズ60が設けられている。ランプハウス23には例えばハロゲンランプ23aが収容されている。

【0019】 照明支柱20、ランプハウス23、ミラー25、ポラライザ26、ウオラストンプリズム27、及びコンデンサレンズ60で微分干渉観察用透過照明光学系が構成される。

【0020】 また、ベース11の他端には鏡筒12が設けられ、鏡筒12には対物レンズ33によって生じた像を肉眼で観察できるように拡大する接眼レンズ13が設けられている。

【0021】ステージユニット30は、試料が載置されるステージ32と、異なる種類の複数の対物レンズ33及びノマルスキプリズム36を保持するレボルバ34と、レボルバ34を保持するレボルバ台35とを備える。

【0022】レボルバ台35はハンドル15によって対物レンズ33の光軸L1方向へ移動できる。

【0023】落射蛍光ユニット40は、ランプハウス41と落射蛍光装置42とフィルタユニット43とを備える。

【0024】フィルタユニット43は複数のフィルタブロックを備え、スライダ(図示せず)によって任意のフィルタブロックを対物レンズL1の光軸上に挿入できる。フィルタブロックは異なる種類の光学素子(例えば励起フィルタ43a、ダイクロイックミラー43b及び吸収フィルタ43c)を備えている。

【0025】ランプハウス41には例えば水銀ランプが設けられている。

【0026】落射蛍光装置42には、集光レンズや視野絞り(図示せず)が設けられている。

【0027】ランプハウス41、落射蛍光装置42及びフィルタユニット43で落射照明光学系が構成される。

【0028】エバネッセント照明装置50はステージ32の上方に配置されている。

【0029】図3は顕微鏡の部分拡大断面図である。

【0030】エバネッセント照明装置50はエバネッセント投光管51と液浸系コンデンサレンズ60とを備える。

【0031】エバネッセント投光管51はアルゴンレーザ(波長:514.5nm)52とコリメータレンズ53とを備える。このエバネッセント投光管51は水溶液8とスライドガラス5との境界面と光軸との交点を中心として回転可能である。

【0032】コンデンサレンズ60は液浸系コンデンサレンズである。コンデンサレンズ60は対物レンズ61、62を備えている。またコンデンサレンズ60にはアルゴンレーザ52から出射された励起光Lを入射させる開口部63と反射光を出射させる開口部64とが設けられている。

【0033】開口部64には励起光Lが境界面に臨界角 $\theta$ 以上で境界面に入射しているか否かを確認するための筒部65が着脱可能に設けられている。筒部65には拡散フィルタ65a、NDフィルタ65b及び確認窓65cが取り付けられている。

【0034】半球形の対物レンズ(先玉)61の側面は水溶液8とスライドガラス5との境界面の法線に対してレーザ光が臨界角 $\theta$ で入射でき出射できるように削り取られ、入射面61aと出射面61bとがそれぞれ形成されている。

【0035】対物レンズ61とスライドガラス5の上面

との間には対物レンズ33の屈折率に近いイマージョンオイル6が挟まれている。

【0036】また、スライドガラス5の下面とカバーガラス7との間には水溶液8が挟まれている。水溶液中にはCy3やローダミン等の蛍光色素によって染色された試料が存在している。

【0037】エバネッセント照明による蛍光観察の場合、アルゴンレーザ52から出射されコリメータレンズ53で平行光とされた励起光Lは、入射面61aから対物レンズ61内へ入射し、スライドガラス5と水溶液8との境界面で反射される。

【0038】このとき、確認窓65cによって反射光を確認する。反射光を確認できない場合には臨界角 $\theta$ となるようにエバネッセント投光管51を回転させて全反射するように入射角を調整し、反射光を確認できた場合には全反射した光がコンデンサレンズ60の外部へ漏れないように筒部65を外して蓋(図示せず)をする。

【0039】境界面の近傍150nm程度の領域ではエバネッセント光が発生し、このエバネッセント光が励起光として試料中の蛍光色素を励起させ、蛍光が発する。

【0040】この蛍光は対物レンズ33、フィルタユニット43等の光学部材を通じて接眼レンズ13に導かれ、試料の蛍光像が観察される。

【0041】一方、上記顕微鏡を用いて他の照明系による観察を行うこともできる。

【0042】透過照明観察の場合、ランプハウス23から出射された光はミラー25、ポラライザ(偏光子)26、ウオラスストンプリズム27、コンデンサレンズ60、スライドガラス5を通じて無色透明の試料が存在する水溶液8へ入射する。

【0043】水溶液8を透過した光は、カバーガラス7、対物レンズ33及びアナライザ(検光子)14等を通じて接眼レンズ13に導かれ、干渉色のコントラストをつけて可視化された微分干渉像が観察される。

【0044】落射蛍光観察の場合、落射照明光学系を装着する。ランプハウス41からの光は落射蛍光装置42、フィルタユニット43及び対物レンズ33を通じて蛍光試薬によって染色された試料が存在する水溶液8へ入射される。

【0045】試料で反射された光は対物レンズ33、フィルタユニット43及び対物レンズを通じて接眼レンズ13に導かれ、試料の蛍光像が観察される。

【0046】この実施形態によれば、顕微鏡の光学系を変更することなくエバネッセント照明によるノイズ成分の少ない蛍光観察と高倍率かつ高分解能の透過照明観察とを1台の顕微鏡で行うことができるとともに、図1に示すように落射照明光学系を装着することによって一般の落射蛍光観察を行うことができる。

【0047】なお、エバネッセント照明による蛍光像の光量は透過照明像の光量に比べて少ないが、透過照明の

ランプ電圧を下げたり、透過照明光の使用波長をNDフィルタで光量を少なくする、あるいはバンドパスフィルタを用いて蛍光の波長と異なる帯域に設定したりする方法によって、エバネッセント照明による蛍光観察と透過照明観察とを同時に行うことができる。そのため、生体の形態像と生体の蛍光色素によって染色された特定部位の蛍光像とを同時に観察することができるようになる。また、観察途中で透過照明用のランプを消灯することによってエバネッセント照明による蛍光像だけを観察することもできる。

【0048】また、レボルバ34を切り換えて対物レンズ33の倍率を変えたときであってもエバネッセント照明の光学系の条件を変える必要がないので、観察時における作業性がよい。

【0049】更に、上記実施形態では、エバネッセント照明装置50を独立したエバネッセント投光管51と液浸系コンデンサレンズ60とで構成したが、エバネッセント投光管51と液浸系コンデンサレンズ60とを一体化してもよい。

【0050】また、上記実施形態は倒立顕微鏡で説明し

たが、正立顕微鏡にも同様に適用することができることは勿論である。

【0051】

【発明の効果】以上に説明したように請求項1に記載の発明の顕微鏡によれば、顕微鏡の光学系を変更したりすることなくエバネッセント照明によるノイズ成分の少ない蛍光観察と高倍率かつ高分解能の透過照明観察とを1台の顕微鏡で行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1はこの発明の一実施形態に係る顕微鏡の側面図である。

【図2】図2は図1のII-II矢視図である。

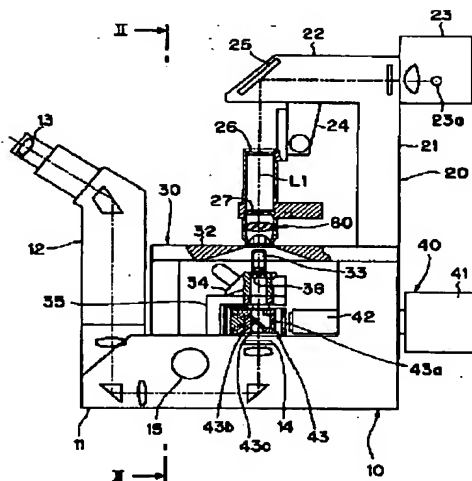
【図3】図3は顕微鏡の部分拡大断面図である。

【図4】図4は従来の顕微鏡の部分拡大断面図である。

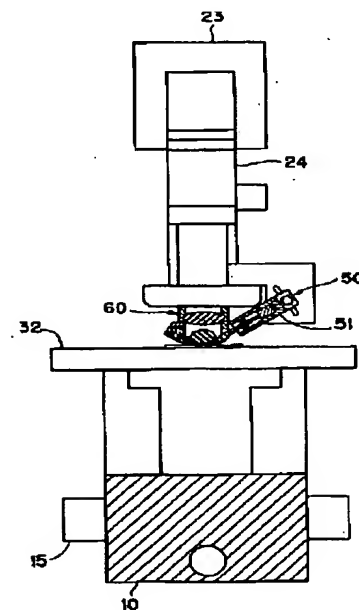
【符号の説明】

8 水溶液  
60 コンデンサレンズ  
61a 入射角  
61b 出射角

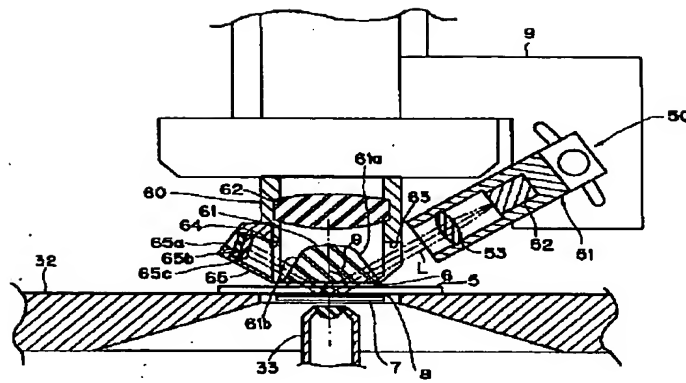
【図1】



【図2】



【図3】



【図4】

